

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CRESCIMENTO E TEMPO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) INCUBADOS EM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

**CURITIBA
2008**

MARIANA FORGATI

**CRESCIMENTO E TEMPO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) INCUBADOS EM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Biologia Celular, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob a orientação da professora Dr^a. Flavia Sant'Anna Rios.

**CURITIBA
2008**

AGRADECIMENTOS

Considerando esta monografia como resultado de uma longa jornada, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Ao pessoal do LAPEP (PUC-PR), especialmente ao Prof. Dr. Peter Gaberz Kirschnik e ao técnico Jorge Mikos, pelo apoio na obtenção e incubação dos embriões.

À professora Lucélia Donatti (UFPR – Biologia Celular), pelo auxílio durante as coletas;

Ao Dr. Paulo César Falanghe Carneiro da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju – SE), pelo auxílio no planejamento e execução dos experimentos.

Ao Eng. Luiz Gonzaga Rios Filho, pelo auxílio no cálculo da regressão para análise da dependência do tempo de desenvolvimento e temperatura.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Adaptativa (Camila, Alana, Anderson, Fernanda e Marcelo), pelo auxílio com coletas e procedimentos diversos.

Gostaria ainda fazer um agradecimento especial à minha professora e orientadora Flavia Sant'Anna Rios, pela paciência, incentivo, apoio e por ter me auxiliado diretamente em todas as etapas deste trabalho.

A todos os professores não mencionados que contribuíram decisivamente para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

A todos os que contribuíram de forma indireta à minha formação acadêmica:

A todos os meus amigos muito especiais da graduação, Banana, Netto, Raul, Halina, Cami Valente, Grazi, Polly, Luana, Nirto, Maíra, Polenta, Bel, Jéssica, Júlia, Fran, Tali, Vini, Gabi, Mineira, Fer Martins, Fer Gurgel, e outros muitos, por todos os momentos: festas, viagens, estudos, desabafos, conselhos... obrigada por tudo!!

Aos meus antigos amigos que permaneceram comigo mesmo com toda a distância, provocada por este curso. Em especial a Fer, Isa, Renata, Rodrigo, Bárbara, Steve e Bruno. O contato é pouco, mas o carinho é imenso!

À minha família, meus fãs incondicionais, que sempre torceram pelo meu sucesso e me deram apoio emocional para enfrentar os desafios que me têm surgido ao longo da minha vida. Além de me apoiarem, tanto quanto possível, às minhas decisões.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1. Obtenção dos Ovos	6
3.2. Incubação dos Embriões	7
3.3. Amostragem dos Embriões	8
3.4. Estadiamento e Morfometria	9
3.5. Cálculo do Tempo Relativo do desenvolvimento	10
3.6. Microscopia de Luz	11
4. RESULTADOS	13
4.1. Tempo do Desenvolvimento Embrionário	13
4.2. Morfometria	18
4.3. Morfologia das Larvas Eclodidas	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Procedimentos para a fertilização <i>in vitro</i> dos ovócitos das fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i>	7
FIGURA 2. Desenho esquemático do sistema de incubação para cada temperatura experimental.....	8
FIGURA 3. Medidas morfométricas realizadas nas larvas eclodidas de <i>Rhamdia quelen</i> . Ilustração adaptada a partir de Sanches et al. (1999).	10
FIGURA 4. Tempo de desenvolvimento de embriões de <i>Rhamdia quelen</i> incubados em quatro diferentes temperaturas	13
FIGURA 5. Tempo de eclosão de <i>Rhamdia quelen</i> incubadas em diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30°C)	15
FIGURA 6. Tempo relativo (%) de cada período do desenvolvimento embrionário de <i>Rhamdia quelen</i> incubadas em diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30°C)	16
FIGURA 7. Dados morfométricos referentes ao estágio de eclosão	19
FIGURA 8. Volume da vesícula vitelina dos embriões de <i>Rhamdia quelen</i> incubados em quatro diferentes temperaturas ao final de cada período do desenvolvimento.....	20
FIGURA 9. Imagens de larvas eclodidas de <i>Rhamdia quelen</i> vivas sob microscópio de luz.....	21
FIGURA 10. Cortes histológicos sagitais de larvas eclodidas de <i>Rhamdia quelen</i>	22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Tempo absoluto (h) de desenvolvimento embrionário de <i>Rhamdia quelen</i> submetidos a diferentes temperaturas de incubação	14
TABELA 2. Tempo relativo (%) de desenvolvimento embrionário de <i>Rhamdia quelen</i> submetidos a diferentes temperaturas de incubação.	17
TABELA 3. Área superficial (mm ²) dos embriões incubados nas diferentes temperaturas	18
TABELA 4. Comprimento dos embriões (mm) incubados nas diferentes temperaturas	18

RESUMO

A temperatura é um fator crítico no desenvolvimento dos peixes. O objetivo desse estudo foi examinar os efeitos da temperatura no desenvolvimento e crescimento durante o período embrionário e estabelecer uma faixa de temperatura ótima para a incubação dos embriões de jundiá (*Rhamdia quelen*). Os embriões foram obtidos através de desova induzida e incubados a 21, 24, 27 e 30°C. Foram amostrados periodicamente, fixados e analisados através de microscopia de luz. Imagens de seis embriões de cada amostra foram capturadas para determinação da área superficial e comprimento do embrião, bem como a área superficial e o volume da célula vitelina. Todos os eventos do desenvolvimento embrionário, da fertilização ($t_0 = 0$) à eclosão, em todas as temperaturas experimentais, tiveram seu tempo relativo estimado e foi avaliada a dependência entre o tempo de desenvolvimento embrionário e a temperatura de incubação. Foram confeccionadas lâminas histológicas, a fim de se traçar uma comparação entre as estruturas nos indivíduos incubados nas diferentes temperaturas experimentais. O tempo de desenvolvimento embrionário foi significativamente maior nas temperaturas mais baixas, sendo expressivamente mais lento nos embriões incubados a 21°C que nas demais temperaturas, mostrando uma correlação negativa entre a temperatura de incubação e o tempo de desenvolvimento embrionário. O volume da vesícula vitelina foi inversamente proporcional ao tempo de desenvolvimento embrionário em todas as temperaturas testadas. Não houve diferença significativa no volume da vesícula vitelina das larvas recém-eclodidas em todas as temperaturas de incubação. A área superficial dos embriões incubados a 30°C foi significativamente maior que nas demais temperaturas, devido, provavelmente, aos edemas cardíacos apresentados pelos indivíduos incubados nessa temperatura. O comprimento total do corpo foi significativamente maior a 27°C e menor a 30°C, sendo intermediário em 21 e 24°C. Histologicamente, foi observado que, na temperatura de 21°C, o comprimento dos miômeros apresentou-se ligeiramente maior, em relação à 27 e 30°C. Os resultados deste estudo indicaram que, assim como para outras espécies de peixes, o desenvolvimento do jundiá é afetado pela temperatura de incubação, sendo que as temperaturas mais altas aceleram o desenvolvimento e as mais baixas o retardam. Além do mais, esta espécie possui diferentes capacidades de consumir energia endógena sob diferentes regimes de temperatura, significando que a taxa de consumo de vitelo é dependente da temperatura de incubação, sendo esta menor em 27 °C até o período de segmentação. Os embriões incubados nessa temperatura resultaram em larvas com um comprimento significativamente maior, o que, provavelmente está relacionado à maior viabilidade das mesmas. Sendo, portanto, 27°C, uma temperatura ótima para a incubação dos embriões de jundiá.

1. INTRODUÇÃO

A história de vida inicial dos peixes é marcada por uma série de eventos cruciais para o desenvolvimento, e o crescimento rápido é uma das principais características desta fase (KAMLER, 1992). Dentre os fatores abióticos, a temperatura tem um importante efeito no desenvolvimento e crescimento dos peixes (BLAXTER, 1992; KAMLER, 1992; BERMUDEZ & RITAR, 1999).

Nos sistemas de piscicultura, a economia geralmente exige que os organismos cultivados atinjam um tamanho ideal o mais rápido possível. Considerando isso, temperaturas elevadas são freqüentemente utilizadas para acelerar o desenvolvimento inicial dos peixes (PETERSON et al., 2004). Entretanto, é possível que a incubação em temperaturas mais altas leve a um maior número de malformações (KLIMMOGIANNI et al., 2004; SAKA et al., 2005)

O jundiá (*Rhamdia quelen*) (QUOY & GAIMARD, 1824) é um peixe teleósteo com distribuição neotropical, do sudeste do México até a região sul da Argentina, pertencente à Ordem Siluriformes e à família Heptapteridae (SILFVERGRIP, 1996).

De acordo com CARNEIRO et al. (2002), existe uma quantidade significativa de grupos de pesquisa brasileiros e de outros países latino-americanos que vêm realizando estudos sobre o jundiá. Os resultados dessas pesquisas atraem cada vez mais pesquisadores interessados em contribuir com o conhecimento sobre esta espécie.

O jundiá vem adquirindo grande importância econômica no sul do Brasil, principalmente, por se tratar de uma espécie nativa bastante adaptada a diferentes ambientes e com crescente aceitação no mercado consumidor.

A variabilidade de ambientes de distribuição do jundiá sugere que seus embriões e larvas possam ser incubados com relativo sucesso em uma ampla faixa de temperaturas. No entanto, fazem-se necessários estudos mais específicos, possibilitando o desenvolvimento de estratégias que reduzam as perdas na larvicultura e criando, dessa forma, novas perspectivas para o cultivo intensivo desta espécie.

A temperatura é um dos fatores ambientais mais decisivos durante o desenvolvimento de peixes (BERMUDES & RITAR, 1999). Logo, a

determinação de uma faixa de temperatura ótima para a incubação de embriões contribui para a melhoria na produção de peixes, em geral, uma vez que indica qual temperatura proporcionará maior crescimento e sobrevivência (MAAREN et al., 1999; PIEDRAS et al., 2004; COOK et al., 2005) sem que o embrião sofra alterações anatômicas ou malformações.

Muitos estudos foram realizados a fim de se determinar a influência da temperatura de incubação no desenvolvimento de teleósteos. WOOD¹ apud JOHNS & HOWELL, 1980, por exemplo, incubou embriões de truta em diferentes temperaturas e verificou que temperaturas de incubação mais altas resultaram em menor eficiência no consumo do vitelo.

A temperatura da água durante a incubação é essencial para a qualidade dos embriões de peixes (SAKA et al., 2004), já que afeta intensamente seu desenvolvimento inicial (CLAIREAUX & LAGARDERE 1999; CONIDES & GLAMUZINA, 2001). Uma vez que o metabolismo é alterado pela temperatura, ocorrem variações no desenvolvimento normal de diversas estruturas do embrião (KINNE & KINNE², apud SAKA et al., 2004; COOK et al., 2005), na duração dos estádios ontogenéticos, no tamanho da larva eclodida e na eficiência na utilização do vitelo (JOHNS & HOWELL, 1980; KAMLER, 1992; KLIMMOGIANNI et al., 2004). Pode, ainda, causar malformações, alterações no gênero (BATTY et al., 1993; WATANABE et al., 1995; OVERNELL, 1997; FUIMAN et al., 1998; BERMUDEZ & RITAR, 1999) e no comportamento das larvas (SAKA et al., 2004).

A tolerância e a magnitude dos efeitos da temperatura dependem não somente das espécies, mas também do estágio de desenvolvimento, já que diferentes fases da vida dos peixes requerem diferentes temperaturas (HERZIG & WINKLER³, apud KLIMMOGIANNI et al. 2004). No entanto, muitos pesquisadores observaram que os efeitos da temperatura são mais

¹ WOOD, A. H. The effect of temperature on the growth and respiration of fish embryos (*Salmo fario*). **Journal of Experimental Biology**, v. 9, p. 271-276, 1932.

² KINNE, O. & KINNE, E. M. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature-salinity-oxygen combinations. **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, p. 231-253, 1962.

³ HERZIG, A.; WINKLER, H. The influence of temperature on the embryonic development of three Cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides* and *Vimba vimba*. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 171-181, 1986.

pronunciados durante o desenvolvimento embrionário e larval (KAMLER, 1992), sendo que, geralmente, temperaturas mais baixas retardam os padrões de desenvolvimento nos peixes e temperaturas mais altas os aceleram (SAKA et al., 2004; YOSEDA et al., 2006), uma vez que baixas temperaturas reduzem a taxa metabólica, enquanto que altas temperaturas elevam o metabolismo (LI & LEATHERLAND, J., 2008).

O tamanho da larva eclodida e a eficiência no consumo do vitelo têm sido freqüentemente utilizados como critério para se estimar uma faixa de temperatura ótima para a incubação de embriões de peixes (POLO et al., 1991; KLIMMOGIANNI et al., 2004), já que estes parâmetros podem indicar efeitos da temperatura tanto no metabolismo quanto no crescimento (BERMUDES & RITAR, 1999). Seguindo esses critérios morfométricos, essencialmente, muitos trabalhos foram desenvolvidos para se determinar a temperatura ótima para a incubação dos embriões, principalmente para espécies de peixes de regiões temperadas, onde a variação térmica sazonal é bastante significativa.

Bioensaios demonstraram que 15 a 19° C é a temperatura ótima de incubação de diversas espécies de Perciformes oriundos do leste do Atlântico e Mar Mediterrâneo, tais como *Sparus aurata* (19±3°C ; POLO et al.⁴, apud SAKA et al., 2004), *Dicentrarchus labrax* (15-17° C; CONIDES & GLAMUZINA, 2001), *Dentex dentex* (16-18 °C; SAKA et al., 2004) e *Pagellus erythrinus* (18 °C; KLIMMOGIANNI et al., 2004). Já o Perciforme do Mar da China, *Pagrus major*, pode se desenvolver numa ampla faixa de temperatura, tendo sido observadas eclosões bem sucedidas em águas com temperatura entre 14,5 °C e 25,6 °C (MIEHLAKAKIS & YOSHIMATSU, 1998). Em peixes bentônicos, como o linguado *Solea solea* ou de regiões subpolares, como o bacalhau *Gadus morhua* (Gadiformes, PETERSON et al., 2004), o desenvolvimento embrionário ótimo ocorre quando são incubados em baixas temperaturas. A faixa de temperatura ótima para *S. solea* (Pleuronectiformes) encontra-se entre 8 e 12 °C (BAYNESS et al., 1993), enquanto que para *G. morhua* (Gadiformes)

⁴ POLO, A.; YUFERA, M. & PASCUAL, E. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. **European Aquaculture Society Special Publication 1989**. Bredene, Belgium, vol. 10, pp. 207-208.

a incubação entre 2 a 4 °C proporciona melhores resultados (PETERSON et al., 2004),

Muitos destes autores relataram maior consumo de vitelo em temperaturas de incubação mais altas. Por exemplo, para *Hippoglossus hippoglossus* (PITTMAN et al., 1990), *Dicentrarchus labrax* (MARINO⁵ et al. apud BERMUDES & RITAR, 1999), *Latris lineata* (BERMUDES & RITAR, 1999) e *Epinephelus malabaricus* (YOSEDA et al., 2006) temperaturas mais altas resultaram em larvas menores e com menores reservas de vitelo durante a eclosão.

Não existem estudos descrevendo os efeitos da temperatura no desenvolvimento embrionário do jundiá. Os resultados deste estudo trarão subsídios para melhorar os resultados na larvicultura e, conseqüentemente na produção destes peixes, além de contribuir para enriquecer o conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento de teleósteos.

⁵ MARINO, G., BOGLIONE, C., FINOIA, M.G., BRONZI, P., MONACO, G., BERTOLINI, B., CATAUDELLA, S. Effects of temperature and salinity on comparative embryo development and hatching of *Dicentrarchus labrax* (L.) eggs. In: LAVENS, P., SORGELOOS, P., JASPERS, H., OLLEVIER, P. (Eds.), Larvi'91, **Fish and Crustacean Larviculture Symposium**, Belgium. European Aquaculture Society, Special Publication 14, pp. 230–232. 1991

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram verificar a influência da temperatura no tempo de desenvolvimento e no crescimento de embriões de jundiá (*Rhamdia quelen*), bem como estabelecer qual a faixa de temperatura ótima para a incubação desta espécie.

Como objetivos específicos têm-se:

1. Calcular o tempo absoluto e relativo do desenvolvimento dos embriões nas diferentes temperaturas.
2. Verificar o consumo de vitelo por embriões incubados a 21, 24, 27 e 30°C;
3. Analisar o crescimento dos embriões nas temperaturas testadas;
4. Verificar o tamanho das larvas eclodidas em cada uma das temperaturas testadas;
5. Comparar as diferenças morfológicas entre as larvas recém-eclodidas nas diferentes temperaturas de incubação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 316, Processo 23075.019887/2008-05).

3.1. Obtenção dos Ovos

Matrizes de jundiá (*Rhamdia quelen*), nativas do Rio Pequeno (São José dos Pinhais – PR), foram coletadas através de anzol e redes de espera e, posteriormente, confinadas em tanques escavados. Posteriormente, foram selecionados sete fêmeas e seis machos com base nas características morfológicas indicadoras do grau de maturação sexual para o fornecimento de gametas para a fertilização *in vitro*. O experimento foi realizado no Setor de Piscicultura da PUC - PR (Patronato Santo Antônio, São José dos Pinhais – PR).

Após a seleção das matrizes, os peixes receberam injeção intramuscular de extrato hipofisário de carpa diluído em soro fisiológico para a indução da desova e espermição. As fêmeas receberam duas doses desse extrato, sendo que a primeira delas ocorreu no dia anterior à desova (0,5 mg/kg) e a segunda 12h após a injeção da primeira (5,0 mg/kg). Os machos receberam apenas uma dose (0,5 – 1,0 mg/kg). Após 12h da última dose, machos e fêmeas foram massageados manualmente na região ventral para a extrusão dos gametas (Fig. 1A), os quais foram recolhidos, avaliados quanto à viabilidade e, posteriormente armazenados em recipientes por alguns minutos em temperatura ambiente para a posterior fertilização.

Os gametas masculinos e femininos foram misturados a seco com o auxílio de uma pena (Fig. 1B e 1C) e, posteriormente, foram hidratados. A hidratação possibilitou que ocorresse a fertilização dos ovócitos, já que permitiu o deslocamento dos espermatozóides em direção às micrópilas. A água contendo os zigotos foi trocada diversas vezes para retirada do excesso de sêmen utilizando água proveniente dos tanques das matrizes. Os embriões foram, então, gradualmente aclimatados às correspondentes temperaturas de

incubação: 21, 24, 27 e 30°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). O processo de aclimação térmica levou entre 30 e 90 min.

3.2. Incubação dos Embriões

Os sistemas de incubação utilizados nesse experimento estão esquematizados na Figura 2. As incubadoras foram confeccionadas com garrafas PET invertidas, com capacidade 1,3L com tubos de abastecimento de água, conectados a aberturas nas tampas das garrafas. Aproximadamente 3000 embriões (5 mL) foram mantidos em cada incubadora de 1,3L. Nas extremidades superiores das incubadoras foram acopladas telas de proteção, a fim de se evitar o extravasamento dos embriões para o tanque.

Figura 1 - (A) Procedimento para liberação dos ovócitos das fêmeas de *Rhamdia quelen*, (B) Colocação do sêmen junto aos ovócitos obtidos, (C) Gametas misturados a seco, com o auxílio de uma pena, (D) Amostragem de embriões de *Rhamdia quelen*.

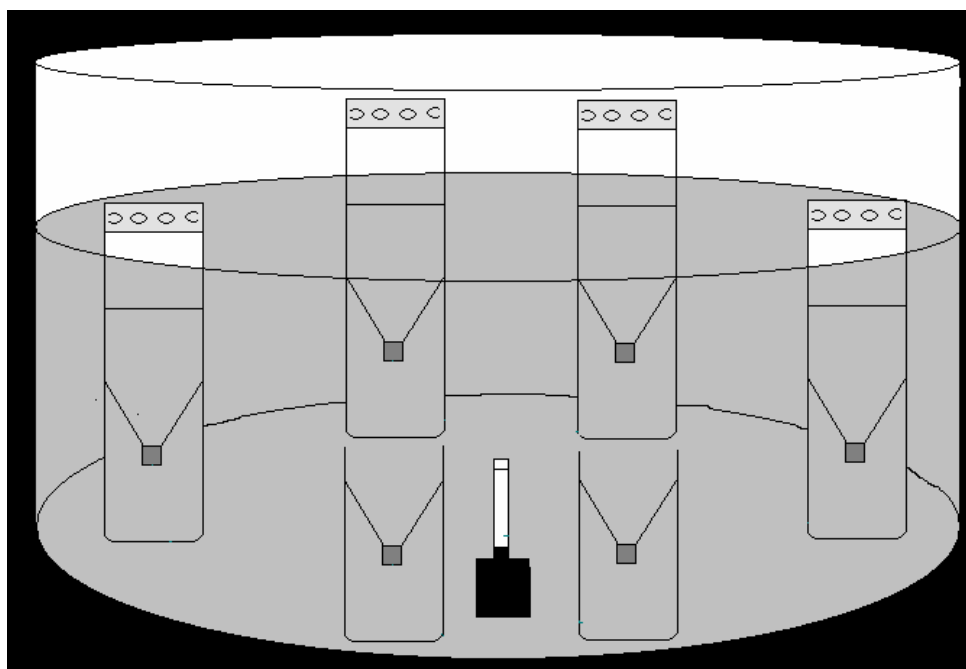


Grupos de seis incubadoras foram armazenados em um tanque circular com capacidade de 100L, mas preenchidos com aproximadamente 70 litros de

água com temperatura constante. Foram utilizados quatro tanques, sendo um para cada temperatura experimental. As temperaturas foram mantidas através de aquecedores acoplados a termostatos, com exceção da temperatura 21°C (temperatura ambiente).

O oxigênio dissolvido foi periodicamente monitorado por um oxímetro YSI – 55 (Hexis) e mantido entre 6,0 e 7,0 mg/L por aeração controlada. A vazão e circulação da água foram controladas através de bombas submersas (2100 L/h) garantindo, além da oxigenação, a movimentação dos embriões, essencial para o desenvolvimento inicial.

Figura 2. Desenho esquemático do sistema de incubação para cada temperatura experimental: 6 incubadoras de 1300 mL, sistema semi-fechado com circulação de água entre as incubadoras e o tanque.



3.3. Amostragem dos Embriões

Durante as primeiras 19 horas de desenvolvimento, os embriões foram amostrados em intervalos de 30 minutos. Cada amostra foi composta por aproximadamente 10 indivíduos. Após isso, os intervalos foram ampliados, passando-se para uma amostra a cada hora até que todos os embriões viáveis incubados em cada temperatura tivessem eclodido.

Os embriões foram retirados das incubadoras, cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de vidro invertida, colocados em uma Placa de Petri para a retirada do excesso de água (Fig. 1D). Fotomicrografias de embriões vivos foram adquiridas através de uma câmera digital Sony-Cyber Shot 7,2 MP acoplada em um microscópio de luz Quimis. Nesse momento, também foram observadas e anotadas algumas características de cada estágio de desenvolvimento. Em seguida, foram transferidos para frascos contendo o fixador Paraformaldeído 4% (PFA 4%) em PBS 0,1M, mantidos a 4°C até a posterior análise. O tempo que as amostras permaneceram no fixador foi variável. Algumas amostras foram analisadas meses após a coleta, permanecendo durante todo este período no fixador PFA 4%.

3.4. Estadiamento e Morfometria

Embriões de todas as amostras foram transferidos para tampão PBS 0,1M, colocados em lâminas de vidro escavadas e analisados diretamente ao microscópio de luz Zeiss Axiophot®, a fim de se identificar os estádios correspondentes em cada embrião. O estadiamento foi baseado em RODRIGUES-GALDINO (2006) e KIMMEL et al. (1995). Após a análise, as imagens de seis embriões de cada amostra foram digitalizadas para a posterior morfometria através do software Sigma Scan, Jandel Scientific, v. 3.0. As medidas morfométricas realizadas estão indicadas na Figura 3. O volume da vesícula vitelina (V_{vit}) foi calculado de acordo com a seguinte equação, descrita por KLIMOGIANNI *et al.* (2004):

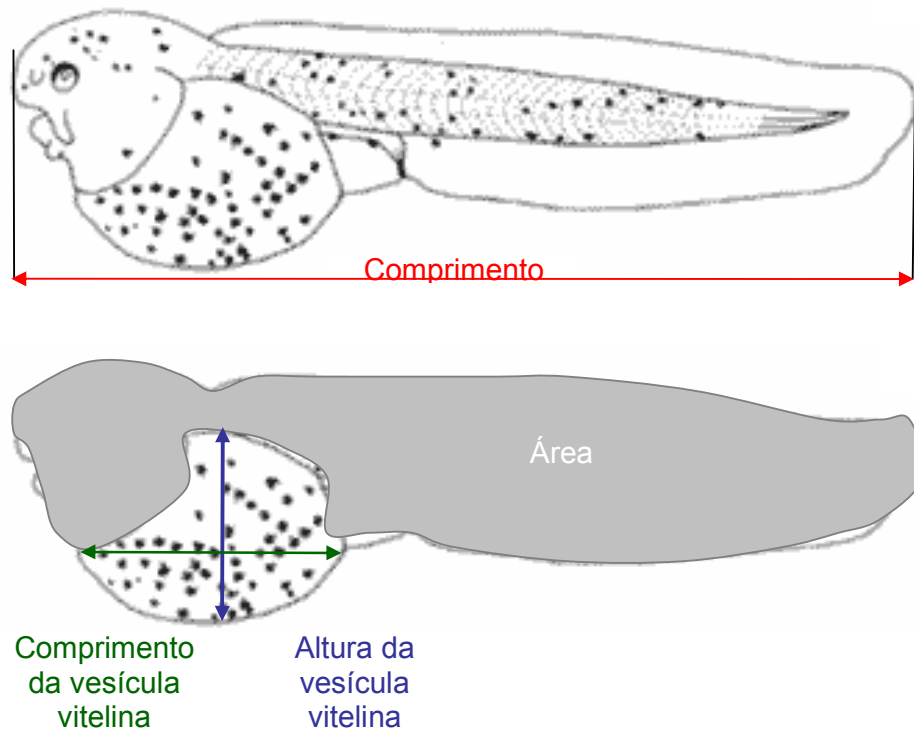
$$V_{vit} = (\pi/6) C_{vit} * A_{vit}^2 \text{ (mm}^3\text{)}$$

onde C_{vit} é o comprimento da vesícula vitelina e A_{vit} é altura da mesma (Fig. 3)

Posteriormente, análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Instat (GraphPad, v. 3.0). A distribuição normal das variáveis foi verificada através do teste Bartlett para a homogeneidade das variâncias. Comparações estatísticas foram realizadas através da ANOVA

seguida pela comparação múltipla de Tukey-Kramer. Os dados foram expressos como média \pm SD (desvio padrão) ou SEM (erro da média), conforme indicado nas figuras e tabelas, e $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

Figura 3. Medidas morfométricas realizadas nas larvas eclodidas de *Rhamdia quelen*. Ilustração adaptada a partir de Sanches et al. (1999).



3.5. Cálculo do Tempo Relativo de Desenvolvimento

Todos os eventos do desenvolvimento embrionário, da fertilização ($t_0 = 0$) à eclosão, em todas as temperaturas de incubação, tiveram seu tempo relativo estimado pela seguinte fórmula (DIVANACH⁶ *apud* KLIMOGIANNI *et al.*, 2004):

$$TR_i = (t_i / Tde) * 100\%$$

Onde, TR_i = tempo relativo do evento do desenvolvimento i ;

t_i = intervalo de tempo entre t_0 (fertilização) e o evento do desenvolvimento i ;
Tde = tempo total da duração do período embrionário, ou seja, tempo até a eclosão.

Foi avaliada a dependência entre o tempo de desenvolvimento embrionário e a temperatura de incubação. Para tanto, foram testadas três equações que reproduzissem os dados obtidos em relação ao tempo de eclosão até obter-se o melhor ajuste dos dados à curva.

3.6. Microscopia de Luz

As larvas recém eclodidas, identificadas como as primeiras amostras cuja membrana coriônica estava ausente, foram selecionadas para a confecção de lâminas histológicas, a fim de se traçar uma comparação entre as estruturas nos indivíduos incubados nas diferentes temperaturas experimentais.

As amostras foram submetidas à desidratação e infiltração seguida pela emblocagem com historesina LEICA®, cujo protocolo está descrito abaixo.

As amostras, fixadas em PFA 4%, foram lavadas em tampão PBS 0,1M em 3 banhos, cada qual com 10 minutos. Em seguida, as mesmas passaram por uma desidratação em série alcoólica: álcool 70%, 80%, 90%, e 100% (2x), sendo cada banho com duração de 10 minutos.

Após a desidratação, as amostras passaram por uma solução contendo álcool 100% e solução de infiltração da Historesina LEICA®, na proporção de 1:1, e nela permaneceram por um período de 4 horas. Em seguida, a solução anterior foi substituída por solução de infiltração pura, sendo que as amostras permaneceram nela por uma semana, havendo uma troca pela mesma solução no meio deste período.

Todo o procedimento para a emblocagem foi realizado sobre gelo, a fim de se evitar a polimerização prematura da resina. A solução de emblocagem foi preparada misturando 4,5 mL da solução de infiltração com 0,1 mL da solução polimerizadora LEICA®. As amostras em solução de

⁶ DIVANACH, P. *Contribution de la Biologie et de l'Élevage de 6 Spérides Méditerranéens: Sparus aurata, Diplodus sargus, Diplodus vulgaris, Diplodus annularis, Lithognathus mormyrus, Puntazzo puntazzo* (Poissons Téléostéens). Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques, Languedoc, 1985.

infiltração foram acomodadas em moldes apropriados para a emblocagem previamente preenchidos com a solução de emblocagem e permaneceram no vácuo por 24 horas para a polimerização da resina.

Na sequência, os blocos de historesina foram cortados em micrótomo com navalha descartável de tungstênio, sendo os melhores cortes selecionados para a coloração com Hematoxilina/Eosina e Azul de Toluidina.

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas através de câmera digital Sony Cyber Shot acoplada a um microscópio de luz Quimis[®].

4. RESULTADOS

4.2. Tempo de Desenvolvimento Embrionário

Observou-se, através das análises dos estádios dos embriões de cada amostra, que o tempo de desenvolvimento embrionário de jundiá (*R. quelen*) foi maior nas temperaturas mais baixas, sendo expressivamente mais lento nos embriões incubados a 21°C que nas demais temperaturas ($P < 0,05$), conforme resumido na Figura 4 e Tabela 1.

Figura 4 –Tempo de desenvolvimento de embriões de *Rhamdia quelen* incubados em quatro diferentes temperaturas.

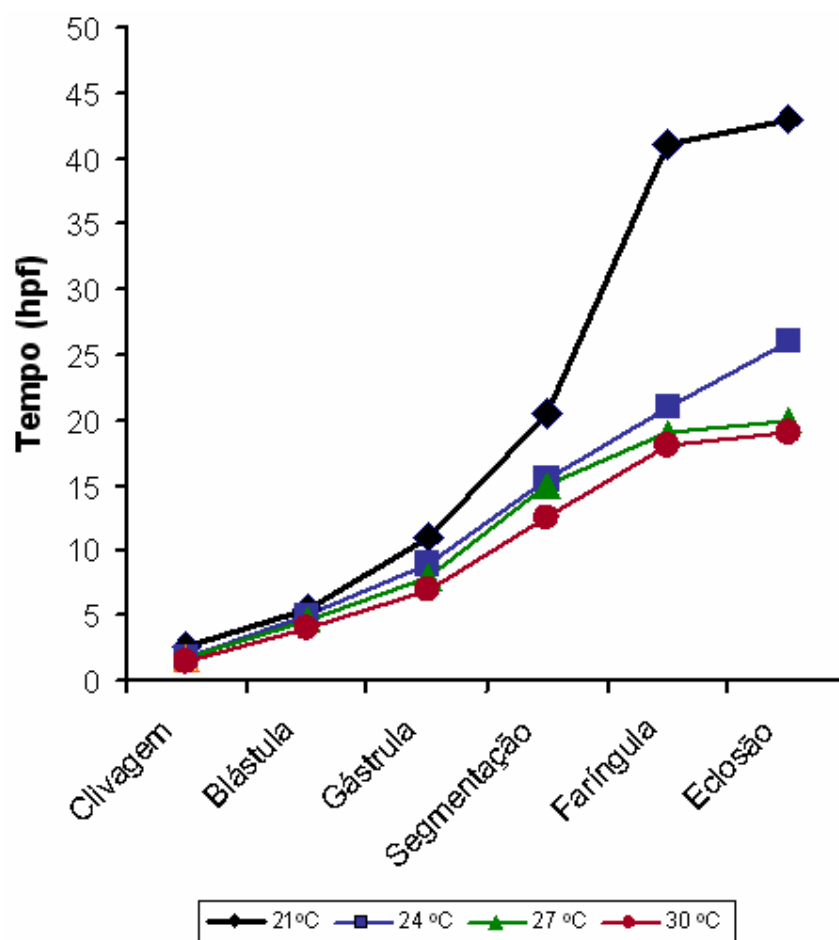


Tabela 1 – Tempo absoluto (h) de desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes temperaturas de incubação

			Tempo de desenvolvimento (hpf)			
Período	Estádio		21°C	24 °C	27 °C	30 °C
Zigoto	E.1	1 célula	0:00	0:00	0:00	0:00
Clivagem	E.2	2 células	0:40	0:40	*	*
	E.3	4 células	1:00	1:00	1:00	*
	E.4	8 células	1:30	1:15	1:10	1:00
	E.5	16 células	2:00	1:30	1:20	1:10
	E.6	32 células	2:20	1:40	1:30	1:20
	E.7	64 células	2:40	1:50	1:45	1:30
Blástula	E.8	Blástula Inicial	3:00	2:00	2:00	1:45
	E.9	Blástula Média	4:00	3:00	2:30	2:00
	E.10	Blástula Tardia	5:00	4:00	3:00	2:30
	E.11	30% Epibolia	5:30	5:00	4:45	4:00
Gástrula	E.12	50% Epibolia	6:00	6:00	5h15	5:00
	E.13	75% Epibolia	9:30	6:30	6:00	5:30
	E.14	Botão Caudal	10:00	7:30	7:00	6:00
	E.15	Nêurula	11:00	9:00	8:00	7:00
Segmentação	E.16	2-3 somitos	11:30	9:30	8:30	7:30
	E.17	6 somitos	15:00	11:15	9:00	8:00
	E.18	10 somitos	15:30	12:00	10:00	8:30
	E.19	14 somitos	16:30	13:00	11:00	9:00
	E.20	18 somitos	17:30	14:00	11:30	10:30
	E.21	25 somitos	20:30	15:30	15:00	12:30
Faríngula	E.22	Faríngula Inicial	26:00	17:00	16:00	14:30
	E.23	Faríngula	40:00	19:00	18:00	16:00
	E.24	Faríngula Tardia	41:00	21:00	19:00	18:00
Eclosão	E.25	Eclosão	43:00	26:00	20:00	19:00

hpf = horas após a fertilização

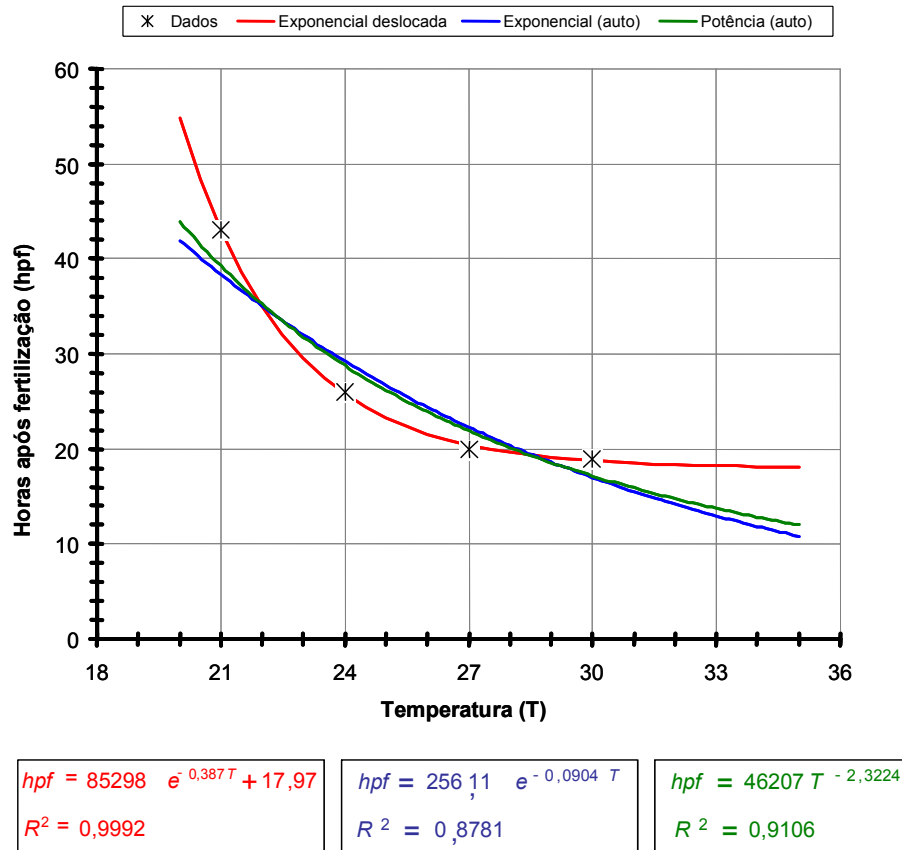
* = nenhum embrião no correspondente estágio.

A Figura 5 demonstra a correlação negativa entre a temperatura de incubação e o tempo de desenvolvimento embrionário. Baseado no modelo de Lasker (1964), KLIMOGIANNI et al. (2004) verificaram a dependência entre tempo de eclosão e a temperatura de incubação em *Pagellus erythrinus*, através de uma potência da temperatura, onde:

$$\text{Tempo de desenvolvimento} = (a \cdot \text{temperatura}^{-b})$$

onde *a* e *b* são constantes.

Figura 5. Tempo de eclosão de *Rhamdia quelen* incubadas em diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30°C). Os dados obtidos nos experimentos estão indicados pelos asteriscos. As linhas azul e verde indicam as regressões calculadas automaticamente pelo software Excel, sendo a linha azul uma exponencial ($hpf = 256,11 e^{-0,0904 T}$, $R^2 = 0,8781$) e a verde uma potência ($hpf = 46207 T^{-2,3227}$, $R^2 = 0,9106$). A linha vermelha representa a exponencial deslocada, procurando interativamente o limite mínimo para obter o melhor ajuste, de modo que a tempo não tenda a zero em uma temperatura infinitamente alta ($hpf = 85298 e^{-0,387 T} + 17,97$, $R^2 = 0,9992$). hpf = tempo de desenvolvimento embrionário em horas após a fertilização. T = temperatura de incubação em graus Celsius.



No entanto, através desta equação, o tempo de desenvolvimento tende rapidamente a zero em altas temperaturas. Utilizando uma equação semelhante a esta, ajustada para os dados obtidos no presente estudo, obteve-se uma curva cujo $R^2 = 0,9106$. A curva exponencial calculada automaticamente pelo software Excel, não apresentou um ajuste satisfatório, sendo $R^2 = 0,8781$. Ambas não reproduzem o que sugerem os dados, ou seja, grande variação do tempo de desenvolvimento nas temperaturas mais baixas e a pouca variação nas temperaturas mais altas. Visando aprimorar a interpretação dos dados, calculou-se uma curva de tendência exponencial deslocada, na qual o tempo mínimo de eclosão não é zero como nas curvas

anteriores. O valor desse deslocamento foi determinado iterativamente de modo a maximizar o coeficiente de correlação, ficando o tempo de desenvolvimento mínimo próximo a 18h. Assim sendo, a equação obtida no presente estudo segue o seguinte modelo:

$$\text{Tempo de desenvolvimento} = (a \cdot e^{-b \cdot \text{temperatura}}) + c$$

onde a , b e c são constantes. No entanto, de acordo com esta equação, não há limite de tempo para o desenvolvimento embrionário em baixas temperaturas.

A 24, 27 e 30°C, o tempo relativo de desenvolvimento foi semelhante, sendo que o período de segmentação foi proporcionalmente maior que os demais (Fig.6 e Tabela 2). Os embriões incubados a 21°C, no entanto, despenderam mais tempo nas etapas finais do desenvolvimento, ou seja, no período de farínghula.

Figura 6. Tempo relativo (%) de cada período do desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* incubadas em diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30°C). Os números no interior das barras indicam a porcentagem de tempo despendida em cada período em relação ao tempo total de desenvolvimento.

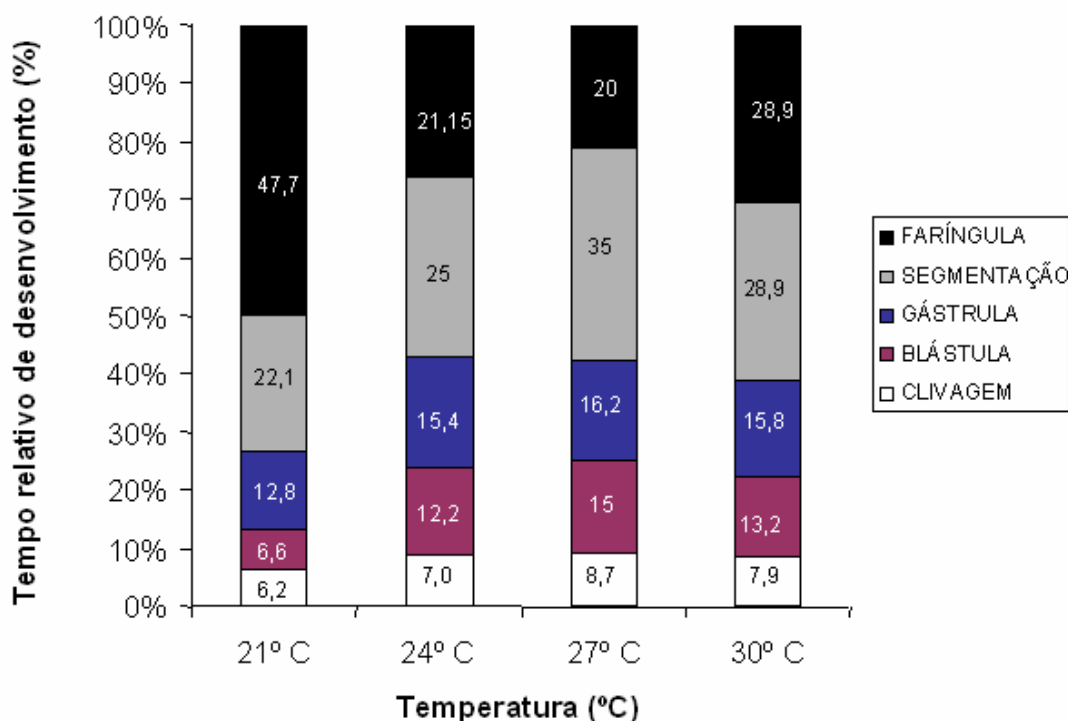


Tabela 2 – Tempo relativo (%) de desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes temperaturas de incubação

			Tempo relativo (%)			
Período	Estádio		21°C	24 °C	27 °C	30 °C
Zigoto	E.1	1 célula	0	0	0	0
Clivagem	E.2	2 células	1,55	2,57	*	*
	E.3	4 células	2,33	3,85	5,00	*
	E.4	8 células	3,49	4,81	5,85	5,26
	E.5	16 células	4,65	5,77	6,65	6,16
	E.6	32 células	5,42	6,42	7,50	7,00
	E.7	64 células	6,21	7,04	8,75	7,89
Blástula	E.8	Blástula Inicial	6,98	7,69	10,00	9,21
	E.9	Blástula Média	9,30	11,54	12,50	10,53
	E.10	Blástula Tardia	11,63	15,38	15,00	13,16
	E.11	30% Epibolia	12,79	19,23	23,75	21,05
Gástrula	E.12	50% Epibolia	13,95	23,08	26,25	26,32
	E.13	75% Epibolia	22,09	25,00	30,00	28,95
	E.14	Botão Caudal	23,26	28,85	35,00	31,58
	E.15	Nêurula	25,58	34,62	40,00	36,84
Segmentação	E.16	2-3 somitos	26,74	36,54	42,50	39,47
	E.17	6 somitos	34,88	43,27	45,00	42,11
	E.18	10 somitos	36,05	46,15	50,00	44,74
	E.19	14 somitos	38,37	50,00	55,00	47,37
	E.20	18 somitos	40,70	53,85	57,50	55,26
	E.21	25 somitos	47,67	59,62	75,00	65,79
Faríngula	E.22	Faríngula Inicial	60,47	65,38	80,00	76,32
	E.23	Faríngula	93,02	73,08	90	84,21
	E.24	Faríngula Tardia	95,35	80,77	95	94,74
Eclosão	E.25	Eclosão	100,00	100,00	100,00	100,0

4.3. Morfometria

As tabelas 3 e 4 indicam o crescimento dos embriões em área e comprimento desde o período de segmentação até a eclosão. Não existe diferença significativa entre a área das larvas eclodidas após incubação a 21, 24 e 27°C. No entanto, as larvas incubadas a 30°C apresentaram uma área superficial maior ($P < 0.05$, Fig. 7B). O comprimento do corpo foi significativamente maior a 27°C e menor 30°C, sendo intermediário em 21 e 24°C (Fig. 7C).

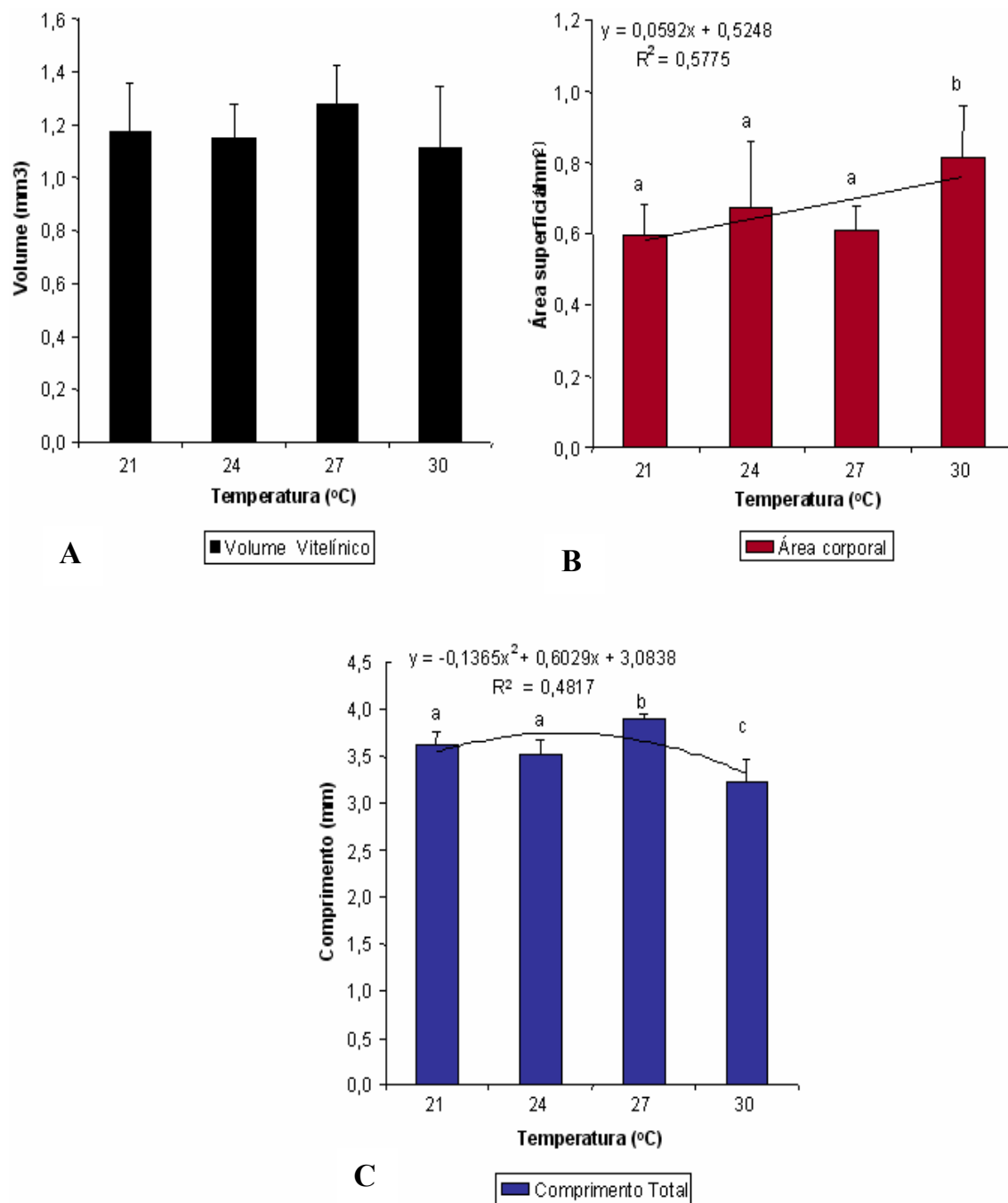
Tabela 3 – Área superficial (mm^2) dos embriões incubados nas diferentes temperaturas (média \pm SEM). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

	Segmentação	Farínula	Eclosão
21 °C	$0,31 \pm 0,01^a$	$0,46 \pm 0,01^a$	$0,59 \pm 0,03^a$
24 °C	$0,36 \pm 0,02^b$	$0,50 \pm 0,02^a$	$0,67 \pm 0,05^a$
27 °C	$0,37 \pm 0,01^b$	$0,49 \pm 0,01^a$	$0,61 \pm 0,03^{ab}$
30 °C	$0,35 \pm 0,01^b$	$0,48 \pm 0,02^a$	$0,81 \pm 0,05^b$

Tabela 4 – Comprimento dos embriões (mm) incubados nas diferentes temperaturas (média \pm SEM). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

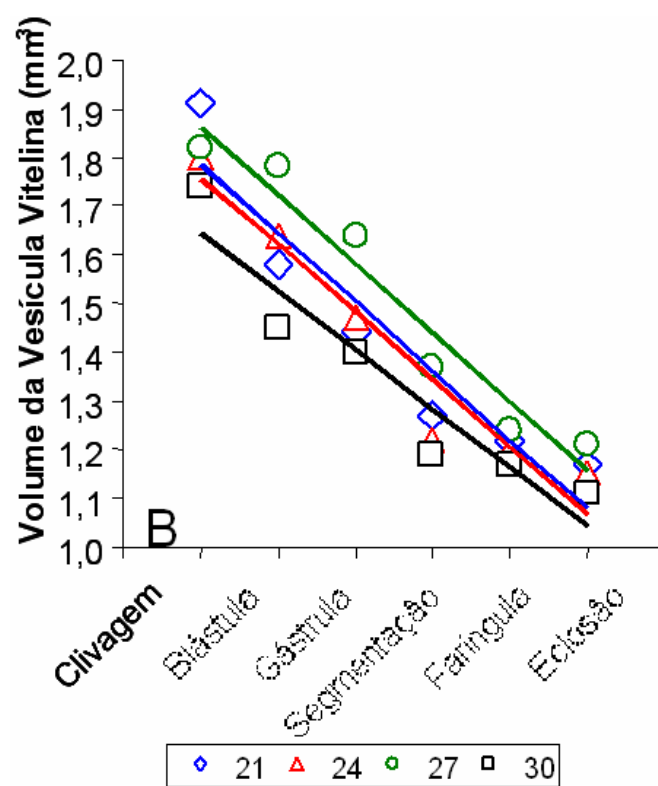
	Segmentação	Farínula	Eclosão
21 °C	$2,56 \pm 0,04^b$	$2,99 \pm 0,03^a$	$3,62 \pm 0,04^a$
24 °C	$2,82 \pm 0,05^a$	$3,24 \pm 0,03^b$	$3,52 \pm 0,04^a$
27 °C	$2,70 \pm 0,04^{ab}$	$3,34 \pm 0,05^b$	$3,89 \pm 0,02^b$
30 °C	$2,74 \pm 0,04^a$	$3,17 \pm 0,04^b$	$3,23 \pm 0,09^c$

Figura 7 – (A) Volume da vesícula vitelínica durante a eclosão; (B) Área superficial das larvas durante a eclosão e (C) Comprimento das larvas durante a eclosão, nas diferentes temperaturas (média \pm SEM). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$)



O volume da vesícula vitelina é inversamente proporcional ao tempo de desenvolvimento embrionário em todas as temperaturas testadas (Fig. 8).

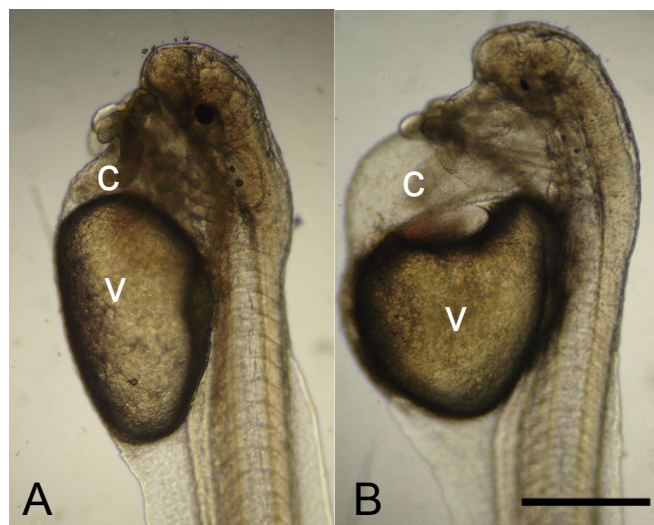
Figura 8 – Volume da vesícula vitelina dos embriões de *Rhamdia quelen* incubados em quatro diferentes temperaturas ao final de cada período do desenvolvimento.



4.3. Morfologia das larvas eclodidas

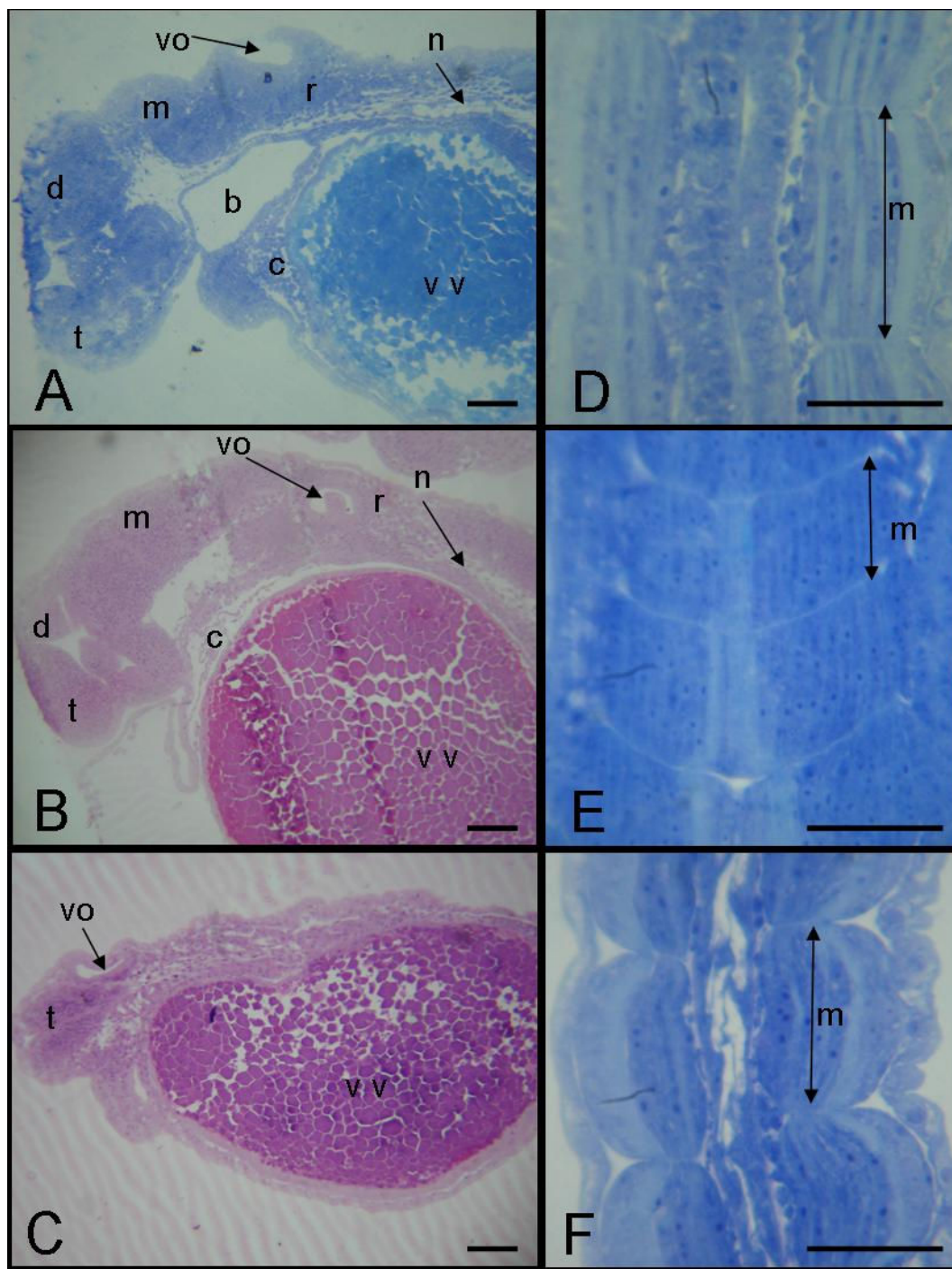
A observação das larvas eclodidas vivas sob microscópio de luz revelou um maior número de malformações, especialmente edema cardíaco (Fig. 9), nos indivíduos incubados a 30°C que nas demais temperaturas. No entanto, não foi possível quantificar a proporção de malformações devido ao grande número de embriões por incubadora. Futuramente, o experimento será repetido de modo a esta estatística ser possível.

Figura 9 – Larvas eclodidas de *Rhamdia quelen* vivas sob microscópio de luz. (A) Indivíduo incubado a 24°C e (B) Indivíduo incubado a 30°C apresentando edema cardíaco. C = cavidade pericárdica; v = vesícula vitelina. Escala: 100 µm.



Cortes histológicos das larvas incubadas nas quatro temperaturas experimentais mostraram poucas diferenças morfológicas. O comprimento dos miômeros é aparentemente maior a 21°C, embora o estágio de diferenciação das fibras musculares pareça semelhante (Fig. 10).

Figura 10 – Cortes histológicos sagitais de larvas eclodidas de *Rhamdia quelen*. Região cefálica de indivíduos incubados a (A) 21°C, (B) 27°C e (C) 30°C. Cortes sagitais do tronco de indivíduos incubado a (D) 21°C, (E) 27°C e (F) 30°C. t = telencéfalo, d = diencéfalo, m = mesencéfalo, r = rombencéfalo, vo = vesícula ótica (cápsula auditiva), n = notocorda, c = coração, vv = vesícula vitelina. As setas com pontas duplas nas figuras D, E e F indicam o comprimento de um miômero (m). Coloração: A, D, E e F = azul de toluidina; B e C = H.E.. Escala: 10 μ m



5. DISCUSSÃO

As diferenças encontradas no crescimento de *R. quelen* durante o período embrionário e tempo de desenvolvimento entre os tratamentos foram atribuídas a diferenças nas temperaturas de incubação.

Foi observado que, assim como em outras espécies de peixes, o desenvolvimento embrionário do jundiá é afetado pela temperatura de incubação. Desta maneira, o presente estudo corrobora com trabalhos anteriores, cujos resultados indicaram que temperaturas mais altas aceleram o desenvolvimento embrionário dos peixes e temperaturas mais baixas o retarda (SAKA et al., 2004; POLO et al., 1991; CONIDES & GLAMUZINA, 2001; MIHELAKAKIS & YOSHIMATSU, 1998; BAYNESS et al., 1993). As larvas de *R. quelen* incubadas a 30°C eclodiram mais rapidamente que as demais, sendo que as incubadas a 21°C foram as últimas a eclodir.

O uso do tempo relativo nos estádios embrionários tem se mostrado uma boa ferramenta para se estabelecer o tempo requerido para atingir os diferentes eventos a qualquer temperatura. KLIMOGIANNI et al. (2004) verificaram que o tempo relativo não se altera com a temperatura de incubação em *Pagellus erythrinus*. No entanto, o mesmo não foi observado em *R. quelen*, no qual o tempo investido no período de faríngula foi maior em temperaturas mais baixas (21°C).

A curva à qual os dados foram melhor ajustados demonstra que o tempo de desenvolvimento nas temperaturas mais baixas é proporcionalmente muito maior, de modo que pequenas variações térmicas provocam grandes alterações no tempo de eclosão. Por outro lado, nas temperaturas mais altas a variação temporal do desenvolvimento é menor. Esta curva considera que, mesmo em temperaturas infinitamente altas, o tempo de desenvolvimento não excede 17,97h e que em temperaturas abaixo de 20°C o tempo de desenvolvimento aumenta muito rapidamente. Os limites reais de tolerância térmica deverão ser determinados em experimentos futuros, visto que, embora não tenha sido quantificado, não parece ter havido mortalidade significativa em nenhuma temperatura testada. Entretanto, a curva obtida, reproduz bem o tempo de desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* incubadas entre 20 e 35°C.

A maior área superficial apresentada pelas larvas eclodidas após incubação a 30° C, pode ser atribuída à presença de edemas cardíacos e não devido a um aumento real da massa corpórea. Vale lembrar que estas larvas apresentaram o menor comprimento dentre todas.

Segundo ATKINSON (1994), para os ectotermos o tamanho de um dado estágio ontogenético, como na eclosão, é inversamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto maior a temperatura de incubação, menor o tamanho da larva eclodida. Uma possível explicação seria que altas temperaturas promovem um aumento no metabolismo, reduzindo a energia total disponível para o crescimento e produzindo larvas menores (OJANGUREN & BRAÑA, 2003), o que resulta numa menor eficiência no consumo do vitelo (KAMLER, 1992). Entretanto, o estudo do desenvolvimento de *R. quelen* sugere um mecanismo diferente para esta espécie.

Os resultados deste trabalho indicaram que os embriões de jundiá possuem diferentes capacidades de consumir energia endógena sob diferentes regimes de temperatura, significando que a taxa de consumo de vitelo é dependente da temperatura de incubação, sendo esta menor em 27°C até o período de segmentação. No entanto, as larvas eclodiram com quantidades semelhantes de vitelo. Durante a eclosão, o vitelo deve conter reservas energéticas suficientes para permitir que a larva sobreviva até desenvolver estruturas relacionadas à captura e digestão de alimento.

Os embriões incubados a 27°C adquiriram um comprimento significativamente maior que nos demais tratamentos. O maior comprimento das larvas garante uma maior viabilidade das mesmas, já que melhora a velocidade de natação, capacidade de alimentação e fuga de predadores (PEPIN, 1991). Isto indica uma melhor taxa de conversão do vitelo, ou seja, melhor aproveitamento da energia endógena favorecendo o crescimento. Por outro lado, um aumento de mais três graus na temperatura de incubação (30°C) resultou em larvas menores após a utilização de quantidades semelhantes de vitelo, além de, aparentemente, um maior número de malformações que podem comprometer a sobrevivência das mesmas.

A utilização das reservas endógenas e o tempo de desenvolvimento foram acelerados com o aumento da temperatura. Entretanto, um desenvolvimento acelerado parece ser desvantajoso para a estratégia inicial

de sobrevivência das larvas, uma vez que as mesmas podem utilizar toda a energia proveniente do vitelo antes mesmo de estar apta à captura e digestão de alimento (YOSEDA et al., 2006).

6. CONCLUSÕES

O jundiá (*R. quelen*) tolera uma ampla faixa de temperaturas de incubação. Entretanto, os resultados indicam que os embriões dessa espécie incubados a 27°C resultaram em larvas com um maior comprimento, o que possivelmente está diretamente relacionado com a maior viabilidade das mesmas. Considerando-se conjuntamente o tempo de desenvolvimento e o tamanho das larvas eclodidas, pode-se concluir que a temperatura ótima de incubação dos embriões de jundiá é de 27°C.

É necessário, no entanto, investigar os efeitos de outros fatores bióticos e abióticos na embriologia do jundiá, assim como verificar o efeito da temperatura de incubação como agente teratogênico para esta espécie a fim de se ter um melhor aproveitamento no setor produtivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINSON, D. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? **Advances in Ecological Research**, v. 25, p. 1-58, 1994.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. 212p.
- BATTY, R. S.; BLAXTER, J. H. S. & FRETWELL, K. Effect of temperature on the escape responses of larval herring, *Clupea harengus*. **Marine Biology**, v. 115, n. 4, p. 523-528, 1993.
- BERMUDES, M. & RITAR, A. J. Effects of temperature on the embryonic development of the striped trumpeter (*Latris lineat*/ Bloch and Schneider, 1801). **Aquaculture**, v. 176, p. 245-255, 1999.
- BLAXTER, J. H. S. The effect of temperature on larval fishes. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 42, p. 336-357, 1988.
- CARNEIRO, P. C. F. et al. Jundiá: Um grande peixe para a região sul. **Panorama da Aqüicultura**, v. 12, n. 69, p. 41-46, 2002.
- CLAIREAUX, G. & LAGARDERE, J. P. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. **Journal of Sea Research**, v. 42, n. 2, p. 157-168, 1999.
- CONIDES, A. & GLAMUZINA, B. Study on the effects of rearing density, temperature and salinity on hatching performance of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture International**, v. 9, n. 3, p. 217-224, 2002.
- COOK, M. A.; GUTHRIE, K. M.; RUST, M. B. & PLESHA, P. D. Effects of salinity and temperature during incubation on hatching and development of lingcod *Ophiodon elongatus* Girard, embryos. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1298-1303, 2005.
- FUIMAN, L. A.; POLLING, K. R. & HIGGS, D. M. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. **Copeia**, v. 1998, n. 3, p. 602-611, 1998.
- GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-175, 2000.

- JOHNS, D. M. & HOWELL, W. H. Yolk Utilization in Summer Flounder (*Paralichthys dentatus*) Embryos and Larvae Reared at Two Temperatures. **Marine Ecology**, v. 2, p. 1-8, 1980.
- KAMLER, E. **Early Life History of Fish: An Energetics Approach**. London: Chapman & Hall. 1992. 288p.
- KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p. 253-310, 1995.
- KLIMOGIANNI, A. et al. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common Pandora, *Pagellus erythrinus*. **Marine Biology**, v. 145, n.5, p. 1015-1022, 2004.
- LASKER, R. An experimental study of the effect of temperature on the incubation time, development and growth of Pacific sardine embryos and larvae. **Copeia**, v.1964, p. 399–405, 1964.
- LI, M.& LEATHERLAND, J. Temperature and ration effects on components of the IGF system and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during the transition from late stage embryos to early stage juveniles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 668-679, 2008
- MAAREN, C. C. V.; KITA, J. & DANIELS, H. V. Temperature tolerance and oxygen consumption rates for juvenile southern flounder *Paralichthys lethostigma* acclimated to five different temperatures. **UJNR Technical Report**, v. 28, p. 135-140, 1999.
- MARTELL, D. J.; KIEFFER, J. D. & TRIPPEL, E. A. Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. **Journal of Fish Biology**, v. 66, n. 6, p. 1558-1575, 2005.
- MIHELAKAKIS, A. & YOSHIMATSU, T. Effects of salinity and temperature on incubation period, hatching rate and morphogenesis of the red sea bream. **Aquaculture International**, v. 6, n. 2, p. 171-177, 1998.
- OJANGUREN, A. F. & BRAÑA, F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 3, p. 580-590, 2003.
- OTTERLEI, E. et al. Temperature-and-size-dependent growth of larval and early juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): a comparative study of

- Norwegian coastal and northeast Arctic cod. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 56, n. 11, p. 2099-2111, 1999.
- OVERNELL, J. Temperature and efficiency of development during endogenous feeding in herring embryos and yolk-sac larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 2, p. 358-365, 1997.
- PEPPIN, P.; ORR, D. C. & ANDERSON, J. T. Time to hatch and larval size in relation to temperature and egg size in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 54, n. 1, p. 2-10, 1991.
- PETERSON, R. H.; MARTIN-ROBICHAUND, D. J. & HARMON, P. Influence of incubation temperature on body movements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) embryos and on size at hatch. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 5, p. 453-457, 2004.
- PIEDRAS, S. R. N.; MORAES, P. R. R & POUEY, J. L. O. F. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 2, p. 177-182, 2004.
- PITMAN, K.; BERG, O.; OPSTAD, I.; SKIFTESVIK, A. SKJOLDDAL, L. & STRAND, H. Development of eggs and yolk sac larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) **Journal of Applied Ichthyology**, v. 6, p. 142-160, 1990.
- POLO, A.; YUFERA, M. & PASCUAL, E. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. **Aquaculture**, v. 92, p. 367-375, 1991.
- RODRIGUES-GALDINO, A. M. **Estádios do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Siluriformes, Heptapteridae)**. Curitiba, 2006. (conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- SANCHES, P. V.; NAKATANI, K.; BIALETZKI, A.. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná River. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 59, n. 3, 1999.

- SAKA, Ş., FIRAT, K & ÇOBAN, D. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 3, p. 224-231, 2004.
- SILVA, L. V. F. Incubação e Larvicultura. In: BALDISSEROTTO, B & RADÜNZNETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. p. 107-116.
- WATANABE, W. O. et al. Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolk sac larvae of the Nassau grouper *Epinephelus striatus*. **Aquaculture**, v. 136, n. 1/2, p. 141-147, 1995.
- YOSEDA, K.; DAN, S.; SUGAYA, T.; YOKOGI, K; TANAKA, M. & TAWADA, S. Effects of temperature and delayed initial feeding on the growth of Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*) larvae. **Aquaculture**, v. 256, p. 192-200, 2006.